

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 224—228, Mai 1971

Quantitative Simultan-Immunelektrophorese

Eine Mikromethode zur gleichzeitigen Bestimmung aller Serumproteine einschließlich der Immunglobuline

Von W. STEPHAN¹⁾ und U. FRAHM

Aus der Wissenschaftlichen Abteilung (Leiter: Dr. H. Schleussner) der Biotest-Serum-Institut GmbH Frankfurt/Main

(Eingegangen am 13. Januar 1971)

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Serumproteine beschrieben, die geringe Mengen Antiserum benötigt und mit dem normalen Immunelektrophorese-Zubehör auskommt. Bei Verwendung von Antihumanserum werden alle klinisch bedeutsamen Proteine einschließlich der Immunglobuline gleichzeitig dargestellt. Die Technik ist als Routinemethode geeignet. Die klinische Bedeutung wird anhand pathologischer Seren demonstriert.

Quantitative simultaneous immunoelectrophoresis

(A micromethod for the simultaneous determination of all serum proteins, including the immunoglobulins)

A method is described for the quantitative determination of serum proteins, which requires very small amounts of antiserum and is performed with the usual immunoelectrophoresis apparatus. Using antihuman serum, all the clinically important proteins, including the immunoglobulins are revealed in one analysis. The method is suitable for routine analyses and its clinical application is illustrated with pathological sera.

Aus zahlreichen Arbeiten geht die Bedeutung der zwei-dimensionalen LAURELL-Elektrophorese für die klinische Diagnostik hervor (1, 2, 3). Ein besonderes Interesse beanspruchen in diesem Zusammenhang die für die Routineanalytik entwickelten Mikromethoden (4, 5). Ein gewisser Nachteil dieser, zuerst von LAURELL (6) angegebenen Technik liegt darin, daß die gleichzeitige Darstellung der γ -Globuline zusammen mit den übrigen Serumproteinen in einer Analyse nicht möglich ist. Dies liegt im Prinzip der Technik begründet, da es für die optimale Darstellung der einzelnen Serumfraktionen nötig ist, daß die Immunglobuline des Antiserums im elektrischen Feld nicht wandern; für die γ -Globuline der Serumprobe gilt naturgemäß das gleiche, so daß sie nicht in die antikörper-haltige Agarose eindringen können.

Eine quantitative Erfassung der γ -Globuline gelingt dagegen durch Erhöhung der negativen Ladung der Proteine, insbesondere der γ -Globuline der Serumprobe. Dies erreicht man rasch und schonend durch Behandlung des Serums mit einer geeigneten Menge β -Propiolacton. Neben diesem Agens kann, wie WEEKE (7) gezeigt hat, auch KCNO verwendet werden.

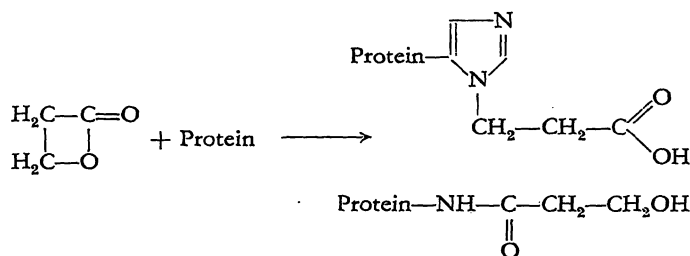
Da durch die LAURELL-elektrophoretische Auftrennung eines geeignet chemisch modifizierten Serums das gesamte Spektrum der Serumprobe gleichzeitig quantitativ bestimmbar ist, schlagen wir für diese Technik die Bezeichnung „Quantitative Simultan-Immunelektrophorese“ vor.

Prinzip

Reaktion der Serumproteine mit β -Propiolacton

Als alkylierendes und acylierendes Agens reagiert β -Propiolacton vor allem mit dem Histidin und Lysin der Serumproteine.

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen auf dem 2. Kongreß der Gesellschaft für Immunologie, Oktober 1970, Wien.



Hierbei wird die negative Ladung und damit die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld erhöht (Abb. 1).



Abb. 1
Immunelektrophoretische Auftrennung von Normal-Humanserum in Agarose (Darstellung mit Antihumanserum vom Kaninchen)
oben: nicht modifiziert
unten: nach Modifizierung mit β -Propiolacton

Für unser Problem ist vor allem von Bedeutung, daß die γ -Globuline nach der Modifizierung in die gleiche Richtung wie die übrigen Serumproteine wandern. Für die Auswertung dieses Prinzips in der Praxis ist es wichtig, daß die Modifizierungs-Bedingungen einfach und die Ergebnisse reproduzierbar sind.

Im folgenden werden hierfür optimale Bedingungen angegeben, die routinemäßig durchführbar sind.

Modifizierungsbedingungen

Drei Aspekte stehen im Vordergrund:

1. Die Reaktionsfähigkeit von β -Propiolacton hängt von der Esterase-Aktivität der einzelnen Seren ab

- (8, 9). Standardverhältnisse werden erreicht, indem man die Esterase-Aktivität durch EDTA-Zusatz infolge Ca^{++} -Bindung auf Null herabsetzt.
- Die β -Propiolacton-Konzentration muß so gewählt werden, daß man den gewünschten Effekt erzielt, ohne die immunologischen und andere biochemische Eigenschaften der Serumproteine wesentlich zu verändern.
 - Die Modifizierung muß rasch durchführbar sein und keinen großen apparativen und chemischen Aufwand erfordern.

Hieraus ergibt sich das Schema der Tabelle 1.

Tab. 1
Modifizierungsschema

Modifizierungsbedingungen	Begründung
Serumprobe: 8,0 ml (2,5 g/100 ml)	Kompromiß zwischen einer möglichst geringen Menge Patienten-Serum und der Notwendigkeit der pH-Wert-Nachprüfung
EDTA: 12 mg	Standardisierung der einzelnen Serumproben bezüglich der Esteraseaktivität und damit der Reaktivität von β -Propiolacton
pH: 8,0 (pH-Konstanz durch Zugabe von 1N NaOH)	Erhöhung der Reaktivität der Serumproteine Abfangen der durch Hydrolyse von β -Propiolacton entstehenden H^+ -Ionen
Temperatur: 37°C	Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, so daß die Reaktion nach 2 Std. beendet ist
β -Propiolacton: 20 μl	Ausreichende Menge, um die Ladung der Immunglobuline zu erhöhen, ohne die immunologischen Eigenschaften der Serumproteine zu ändern

Das auf diese Weise modifizierte Serum wird dann nach der von uns beschriebenen Mikromethode aufgetrennt (5). Infolge der Reaktion von β -Propiolacton mit den Serumproteinen weicht das Bild einer „Simultan-Immun-Elektrophorese“ deutlich von dem einer „Normal-LAURELL-Elektrophorese“ ab.

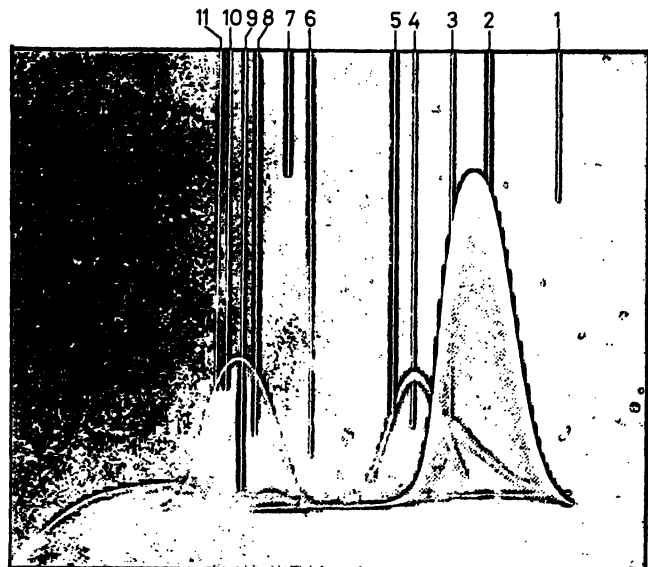
Bezeichnung der Fraktionen

Durch die Reaktion von β -Propiolacton mit den Serumproteinen tritt eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Verschiebung der einzelnen Serumfraktionen zueinander auf. Die charakteristische Gestalt der Peaks bleibt jedoch erhalten, so daß die Neuorientierung leicht fällt (Abb. 2a + b, Tab. 2).

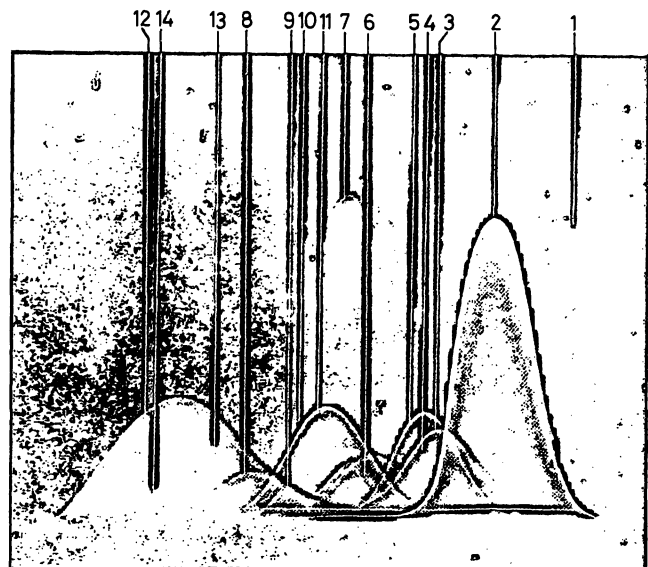
Tab. 2

Identifizierung der LAURELL-elektrophoretischen Peaks der Abb. 2a und b

Serumprotein	Nr.
Präalbumin	1
Albumin	2
α_1 -Lipoprotein	3
saures α_2 -Glykoprotein	4
α_2 -Antitrypsin	5
α_2 -Makroglobulin	6
Haptoglobin	7
β_1 A-Globulin	8
β -Lipoprotein	9
Hämopexin	10
Transferrin	11
Ig G	12
Ig A	13
Ig M	14



a



b

Abb. 2a und b
LAURELL-elektrophoretische Darstellung von Normal-Humanserum
a) nicht modifiziert
b) nach Modifizierung mit β -Propiolacton

Im folgenden wurde geprüft, ob auch im Falle des modifizierten Serums die notwendige Proportionalität zwischen Protein-Konzentration und Höhe des LAURELL-Peaks besteht.

Quantitative Beziehungen

Zum Nachweis der Proportionalität zwischen Protein-Konzentration und Peakhöhe wurde ein modifiziertes Serum in 4 Verdünnungen aufgetrennt und die Höhe der Peaks gegen die Gesamtprotein-Konzentration aufgetragen (Abb. 3).

Der Abbildung entnimmt man, daß die geforderte lineare Abhängigkeit in den ersten 3 Stufen für alle der untersuchten Proteine besteht. Das „Abknicken“ einiger Geraden liegt daran, daß in diesen Fällen die Antikörper-Konzentration nicht zur vollständigen Präzipitation des korrespondierenden Antigens ausreicht. Der

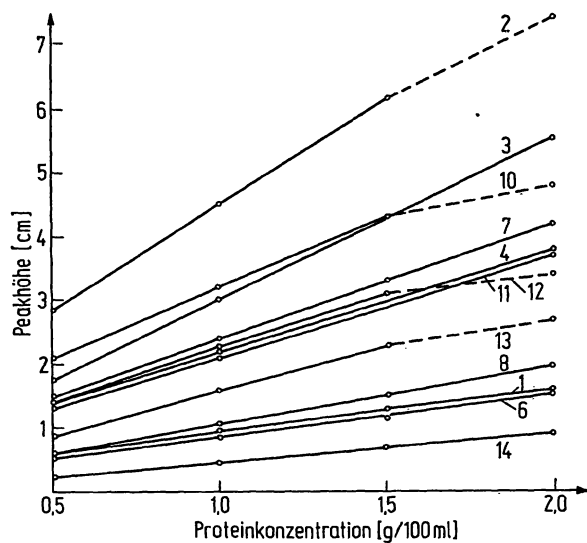


Abb. 3

Abhängigkeit der Höhen der LAURELL-Elektrophorese-Peaks vom Gesamtproteingehalt

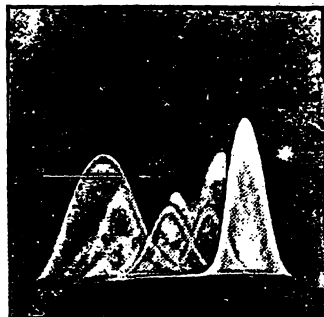
klinisch-diagnostische Wert der beschriebenen Methode wird anhand pathologischer Seren deutlich.

Prüfung pathologischer Seren

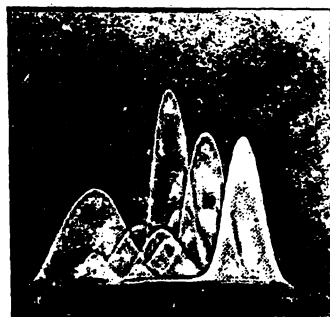
Es wurde das Serum eines Patienten mit Morbus HODGKIN (Protein: 6,4 g/100 ml) sowie ein Lebercirrhose-Serum (Protein: 6,2 g/100 ml) untersucht (Abb. 4a bis 4d).

Durch Vergleich mit dem Standard-Serum (Protein: 7,5 g/100 ml) (Messung der Höhen bzw. der Flächen der interessierenden Peaks) gelangt man zu den Werten der Tabelle 3. Diese Werte wurden unter Berücksichtigung des Gesamtproteingehalts erhalten.

Im Falle des Cirrhose-Serums sind die γ -Globuline so stark erhöht, daß bei der gewählten Verdünnung des Patientenserums (Protein-Konzentration 1 g/100 ml) die Antikörper-Konzentration für eine vollständige Immunpräzipitation nicht ausreicht (Abb. 4c): Man würde deshalb zu niedrige Werte erhalten. Die für die γ -Globuline in Tabelle 3 angegebenen Werte liefert eine zweite Analyse mit verminderter Protein-Konzentration des Patientenserums (Abb. 4d).



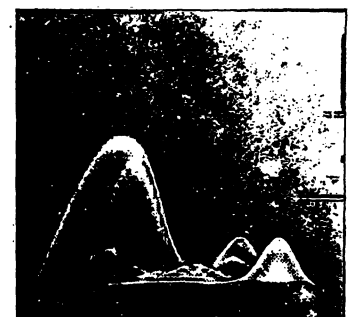
a



b



c



d

Abb. 4a—d

Quantitative Simultan-Immunelektrophorese der pathologischen Seren aus Tab. 3 und des Standard-Serums

a) Standard-Serum (Protein: 1 g/100 ml)
b) HODGKIN-Serum (Protein: 1 g/100 ml)

c) Lebercirrhose-Serum (Protein: 1 g/100 ml)
d) Lebercirrhose-Serum (Protein: 0,5 g/100 ml)

Tab. 3
Konzentration klinisch wichtiger Serumproteine in pathologischen Seren

Serumprotein	Normalwerte (mg/100 ml)	Morbus Hodgkin Flächen (% der Norm)	Morbus Hodgkin Höhen	Lebercirrhose Flächen (% der Norm)	Lebercirrhose Höhen
Präalbumin	25	88	79	Spuren	42
Albumin	4400	86	80	42	42
α_1 -Lipoprotein	360	62	57	Spuren	Spuren
saures α_1 -Glykoprotein	90	137	132	44	49
α_1 -Antitrypsin	290	206	205	98	96
α_2 -Makroglobulin	240	140	120	103	83
Haptoglobin	180	216	200	Spuren	Spuren
Transferrin	295	72	67	39	36
Hämopexin	100	94	97	Spuren	Spuren
β_1 /C/ β_2 A-Globulin	110	139	116	49	43
β -Lipoprotein	530	120	105	75	60
IgG	1250	62	65	190	160
IgA	210	49	50	218	189
IgM	125	42	43	154	125

Wichtig für die Praxis ist ferner die Tatsache, daß im allgemeinen die einfache Höhenmessung anwendbar ist. Lediglich bei stark erhöhter γ -Globulinkonzentration liefert diese Methode zu niedrige Werte, so daß man hier die Flächenmessung ($F = h \cdot \frac{1}{2} b$) heranziehen muß.

Auffallend beim „Hodgkin-Serum“ ist die Verminderung der γ -Globuline IgG, IgA und IgM sowie die Erhöhung der Konzentration der Inhibitor-Proteine: α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin.

Bei dem untersuchten „Lebercirrhose-Serum“ ist neben der starken Erhöhung der γ -Globuline IgG, IgA und IgM besonders bemerkenswert, daß α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin als einzige der gemessenen Proteine in normaler Konzentration vorkommen.

Die Elektrophorese dieses Serums auf Celluloseacetat-Folie liefert die Werte der Tabelle 4.

Tab. 4
Folien-Elektrophoretische Auftrennung von „Lebercirrhose-Serum“ (Angaben in Prozent des Gesamtproteins)

Albumin	α_1 -	α_2 -Globuline	β -	γ -
29,9	2,6	4,6	9,8	53,1

Bildet man den Quotienten $\frac{\text{Albumin}}{\gamma\text{-Globulin}}$, so ergibt sich aus Tabelle 4 der Wert 0,56, während man aus Tabelle 3 nach Umrechnung in mg/100 ml den Wert 0,61 erhält.

Man sieht, wie gut diese so unterschiedlichen Methoden in diesem Punkt übereinstimmen. Außerdem wird deutlich, wie weit sich das klinisch-diagnostische Bild durch Verwendung der quantitativen Simultan-Immunelektrophorese differenzieren läßt.

Beschreibung der Versuche

Reagenzien und Geräte

Zur Herstellung des Agarose-Gels diente 0,075M Barbituratpuffer pH 8,6 folgender Zusammensetzung:

Natrium-Barbiturat: 77,0 g Calciumlactat: 3,85 g
Barbitursäure: 13,8 g Natriumazid: 1,00 g
mit entsalztem Wasser ad 5 l.

Für die Elektrophorese wird der Puffer auf 0,0375M verdünnt.

Als Antiserum wurde Antihumanserum vom Kaninchen der Fa. Medac (Hamburg) (Abb. 4a—4d) und der Fa. Behringwerke (Marburg) (Abb. 2a + b) verwendet.

Die Agarose wurde von der Fa. L'Industrie Biologique Francaise S. A. (Gennevilliers) bezogen.

Zur Markierung des Albumins wurde eine Lösung aus 0,2 g Bromphenolblau in 100 ml Barbituratpuffer 0,0375M benutzt.

Filterpapier (2043b Mgl.) lieferte die Fa. Schleicher & Schüll (München).

Die elektrophoretische Auftrennung wurde in der „Elphor“-Kammer für Immunelektrophorese der Fa. Bender & Hobein (München) durchgeführt.

Als Agarose-Träger dienten Diapositiv-Gläser (5 × 5 cm). Zum Auftragen der Serumproben wurde eine Terumo-Mikrospritze (UMS 10) der Fa. Shandon (Frankfurt) und zum Stanzen der Auftragsbrunnen ein Well Cutter (LKB 6818A: Ø 1,5 mm) der Fa. Gelman benutzt.

Aufgetrennt wurden je 1,5 µl Humanserum (Proteinkonzentration 1,0 bzw. 1,25 g/100 ml). Als Standard diente ein Mischserum von 40 gesunden männlichen Blutspendern.

Modifiziert wurde mit β-Propiolacton der Fa. Fluka AG (Buchs/Schweiz) im Autotitrator Radiometer Copenhagen (Fa. Hillerkus/Krefeld).

Arbeitsgang

Modifizierung der Serumprobe mit β-Propiolacton

Man ermittelt den Gesamtproteinwert mit der Biuret-Methode und verdünnt die Serumprobe anschließend mit physiol. NaCl-Lösung auf eine Protein-Konzentration von 2,5 g/100 ml. Zu 8 ml dieser Serumverdünnung gibt man 12 mg EDTA und titriert nach Erwärmung auf 37° mit 1N NaOH auf pH 8,0. Anschließend gibt man 20 µl β-Propiolacton hinzu und hält den pH-Wert bei 37° während 2 Stdn. auf 8,0 durch Zugabe von 1N NaOH (Kontrolle alle 10 Min. oder Arbeiten im pH-Stat).

Die modifizierte Serumprobe wird zur weiteren Untersuchung auf eine Proteinkonzentration von 1,0 bzw. 1,25 g/100 ml mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt. Zu 9 Teilen der verdünnten Serumprobe gibt man 1 Teil einer 0,2proz. Bromphenolblaulösung, um das Albumin zu markieren.

Vorbereitung der Dia-Gläser

Die Dia-Gläser werden in heißer Detergenzienlösung (z. B. Extran) gründlich gereinigt, anschließend mit heißem Leitungswasser, entsalztem Wasser und vergälltem Äthanol sorgfältig gespült und auf Filterpapier im Wärmeschrank bei 60° getrocknet. Die Kanten der Gläser werden mit 1—2proz. wäßriger Agarose-Lösung mittels eines schmalen Pinsels bestrichen und bei 60° getrocknet. Durch diesen Vorstrich bewirkt man ein festes Anhaften des Agarose-Gels.

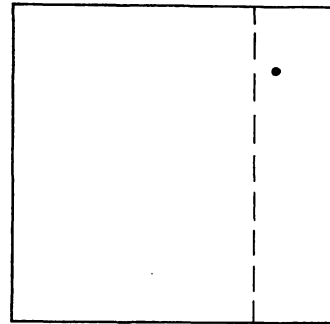
Bereitung der Platten für den 1. Elektrophorese-Schritt

In einem Wasserbad von 50° erwärmt man sieben 5 ml-Glasfläschchen mit jeweils 2 ml Puffer. Aus 1,0 g Agarose, 0,05 g Natriumazid und 50 ml dest. Wasser bereitet man in einem sie-

denden Wasserbad ein Gel, das man anschließend auf 50° temperiert. Jeweils 2 ml dieser Agarose-Lösung werden in jedes Pufferfläschchen gegeben und nach Durchmischung auf ein Dia-Glas gegossen, das absolut waagrecht liegen muß (Nivelliertisch). Nach dem Erstarren werden die Platten in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Das restliche Agarose-Gel wird zur Herstellung der Antikörper-Agarose benötigt und verbleibt im Wasserbad.

Erste Phase der Elektrophorese

In eine wie oben gegossene Platte wird mit einem Lochmesser von Hand nach einer Vorlage (Skizze 1) ein Loch gestanzt und mit einer Wasserstrahlpumpe ausgehoben.



Skizze 1

Mit einer Mikrospritze werden 1,5 µl der 1,0 bzw. 1,25proz. Serumprobe aufgetragen (Verdünnung wie oben beschrieben). Man entfernt die Objektträgerbänke und legt die Platten direkt auf den Verbindungsblock der Immunelektrophoresekammer „Elphor“; die Verbindung mit dem Puffer wird durch Filterpapier hergestellt. Zur elektrophoretischen Auftrennung des Proteingemisches werden 1,5—2 Stdn. bei 300 Volt benötigt. In dieser Zeit durchwandert das mit Bromphenolblau markierte Albumin eine Strecke von 2,5 cm.

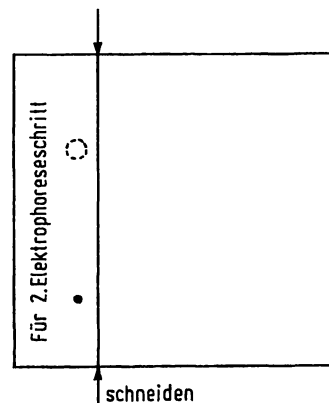
Bereitung der antikörper-haltigen Agarose

Sieben 5 ml-Fläschchen mit je 1,4 ml Puffer und 0,25 ml Antihumanserum vom Kaninchen werden einige Minuten im Wasserbad auf 50° angewärmt, bevor man 1,4 ml der obigen Agarose-Lösung hinzupipettiert und durch einen Gummistopfen verschließt. Erst direkt vor dem Anguß wird der Inhalt durchmischt. Es empfiehlt sich, die vorbereitete antikörper-haltige Agarose-Lösung nicht länger als 20 Min. im Wasserbad aufzubewahren.

Zweite Phase der Elektrophorese

Nach abgeschlossener erster Elektrophorese werden die Platten bis zur weiteren Verwendung in eine feuchte Kammer gelegt. Mit einem Küchenmesser schneidet man, wie in Skizze 2 angegeben, soviel Agarose-Gel ab, daß nur die „Serumauftrennung“ übrig bleibt.

Danach wird mit Antikörper-haltiger Agarose angegossen. Nach dem Erstarren werden die Platten um 90° im Uhrzeigersinn



Skizze 2

gedreht, in die Elektrophoresekammer gelegt und wieder durch Filterpapier mit dem Puffer verbunden. Vor der zweiten Elektrophorese muß umgepolt werden. Sie erfordert etwa 18 Stdn. (über Nacht) bei 200 Volt.

Anfarbeitung und Färbung

Nach beendeter Elektrophorese werden die Platten für etwa 48 Stdn. in 0,9proz. NaCl-Lösung, die + 0,1 % Na-azid enthält, proteinfrei gewaschen. Anschließend werden sie durch Abdecken mit feuchtem Filterpapier (4,7 × 4,7 cm) bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs kann eine Glühbirne verwendet werden.

Die trockenen Präparate werden 5 Min. in 2proz. Essigsäure fixiert, 5 Min. in 0,5proz. Amidoschwarz 10B gefärbt und mit Methanol-Eisessig (9 + 1, v + v) entfärbt.

Reinigung und Auswertung

Die gefärbten und wieder getrockneten Präparate werden mit einem zweiten Dia-Glas bedeckt und, wie in der Photographie üblich, mit Papierstreifen umklebt.

Mit einem Fotovergrößerungsapparat bzw. Dia-Projektor werden die Original-Platten vergrößert. Zur Auswertung wählt man zweckmäßig eine gemeinsame Basislinie, z. B. eine Verbindung der Fußpunkte von Albumin und γ -Globulin. Nun ermittelt man die Höhen der Peaks bzw. die Flächen und vergleicht sie mit denen eines Standardserums.

Man erhält so unter Berücksichtigung des Gesamtproteingehalts die prozentuale Abweichung von der Norm bzw. unter Verwendung der von BECKER und Mitarbeitern (10) angegebenen Werte (Tab. 3) Ergebnisse in mg/100 ml.

Literatur

1. CLARKE, H. G. M. und T. FREEMAN, Clin. Sc., London 35, 403 (1968). — 2. REBEYROTTE, P., Pathol. Biol. 18, 619 (1970). — 3. KRÖLL, J., Protides of the Biological Fluids, 17th Coll. Brugge (1970). — 4. FIRESTONE, H. J. und S. B. ARONSON, Amer. J. Clin. Path. 52, 615 (1969). — 5. STEPHAN, W. und U. FRAHM, diese Z., 5, 469 (1970). — 6. LAURELL, C.-B., Analytic. Biochem. 10, 358 (1965). — 7. WEEKE, B., Scand., J. Clin. Laborat. Invest. 21, 351 (1968). — 8. STEPHAN, W., diese Z. 5, 518 (1969). — 9. STEPHAN, W., diese Z. 6, 481 (1968). — 10. BECKER, W., W. RAPP, H. G. SCHWICK und K. STÖRIKO, diese Z., 6, 113 (1968).

Dr. W. Stephan
6000 Frankfurt-Niederrad
Flughafenstr. 4